

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. Mai 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/035870 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/11**,  
A61K 31/713, C12N 15/88, C07K 14/18, 14/82

[DE/DE]; Glotzdorf 26, 95466 Weidenberg (DE). **LIM-MER, Stefan** [DE/DE]; Gutenbergstrasse 9, 95512 Neudrossenfeld (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/11970

(74) **Anwalt: GASSNER, Wolfgang**; Nägelsbachstrasse 49 A, 91052 Erlangen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
25. Oktober 2002 (25.10.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 55 280.7 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE  
101 58 411.3 29. November 2001 (29.11.2001) DE  
101 60 151.4 7. Dezember 2001 (07.12.2001) DE  
PCT/EP02/00151 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP  
PCT/EP02/00152 9. Januar 2002 (09.01.2002) EP  
102 30 996.5 9. Juli 2002 (09.07.2002) DE

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): RIBOPHARMA AG** [DE/DE]; Fritz-Hornschuch-Strasse 9, 95326 Kulmbach (DE).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): OCKER, Matthias** [DE/DE]; In der Hut 50 a, 91083 Baiersdorf (DE). **HEROLD, Christoph** [DE/DE]; Vierzigmannstrasse 24, 91054 Erlangen (DE). **GEICK, Anke** [DE/DE]; Ludwig-Thoma-Strasse 68, 95447 Bayreuth (DE). **SCHUPPAN, Detlef** [DE/DE]; Baumzeil 2, 91088 Bubenreuth (DE). **VORNLOCHER, Hans-Peter** [DE/DE]; Lise-Meitner-Platz 4, 95448 Bayreuth (DE). **KREUTZER, Roland**

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title:** DRUG FOR TREATING A CARCINOMA OF THE PANCREAS

(54) **Bezeichnung:** MEDIKAMENT ZUR BEHANDLUNG EINES PANKREASKARZINOMS

(57) **Abstract:** The invention relates to a drug for treating a carcinoma of the pancreas, said drug containing a double strand ribonucleic acid (dsRNA) suitable for inhibition of the expression of a K-ras gene.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Medikament zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines K-ras-Gens geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält.



WO 03/035870 A1

**Medikament zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms**

Die Erfindung betrifft ein Medikament und eine Verwendung zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms sowie eine Verwendung zur Herstellung eines solchen Medikaments.

Das Pankreaskarzinom bzw. Adenokarzinom des Pankreas gehört zu den Karzinomen mit den schlechtesten Prognosen. Über die Ursachen der Entstehung des Pankreaskarzinoms ist wenig bekannt. Eine ausreichend erfolgreiche Therapie existiert bisher nicht. Neben anderen genetischen Veränderungen weisen die Zellen des Pankreaskarzinoms häufig eine Mutation im K-ras-Gen auf. Mutationen wurden dabei vor allem in den Codons 12, 13 und 61 nachgewiesen. Das K-ras-Gen ist ein Proto-Onkogen, welches für das GTP-bindende Protein K-ras kodiert. K-ras ist auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran von Zellen lokalisiert und mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen assoziiert. Bindung von GTP aktiviert K-ras. Die Inaktivierung erfolgt durch hydrolytische Abspaltung eines Phosphatrests vom gebundenen GTP. Durch Freisetzen des dabei gebildeten GDPs und erneutem Binden von GTP kann K-ras wieder aktiviert werden. Die genannten Mutationen können zu einem Austausch einer Aminosäure in K-ras und dadurch zu dessen permanenter Aktivierung führen. Die Aktivierung von K-ras aktiviert unter anderem Protein-Kinase C.

Aus der DE 101 00 586 C1 ist ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle bekannt, bei dem ein Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur in die Zelle eingeführt wird. Ein Strang der doppelsträngigen Struktur ist dabei komplementär zum Zielgen. Das der Hemmung zu Grunde liegende Prinzip wird inzwischen als RNA-Interferenz bezeichnet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein wirksames Medikament und eine Verwendung zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms bereitgestellt werden. Weiterhin soll eine  
5 Verwendung zur Herstellung eines solchen Medikaments bereitgestellt werden.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 19 und 20 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den  
10 Merkmalen der Ansprüche 2 bis 18 und 21 bis 38.

Erfindungsgemäß ist ein Medikament zur Behandlung eines, insbesondere humanen, Pankreaskarzinoms vorgesehen, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines K-ras-  
15 Gens mittels RNA-Interferenz geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält. Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus einem oder zwei Ribonukleinsäure-Strängen bestehende Ribonukleinsäure eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht  
20 alle Nukleotide der dsRNA müssen kanonische Watson-Crick-Basenpaarungen aufweisen. Insbesondere einzelne nicht komplementäre Basenpaare beeinträchtigen die Wirksamkeit kaum oder gar nicht. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in dem kürzesten in der dsRNA enthaltenen Strang.

25 Das Medikament kann die dsRNA in einer zu der Hemmung der Expression des K-ras-Gens in dem Pankreaskarzinom ausreichenden Menge enthalten. Das Medikament kann auch so konzipiert sein, dass mehrere Einheiten des Medikaments zusammen die ausreichende Menge in der Summe enthalten. Die ausreichende Menge  
30 hängt von der Verabreichungsform ab. Zur Ermittlung einer ausreichenden Menge kann die dsRNA in steigenden Mengen bzw. Dosierungen verabreicht werden. Danach kann an einer aus dem Pankreaskarzinom entnommenen Gewebeprobe mit bekannten Metho-  
35 den ermittelt werden, ob bei dieser Menge eine Hemmung der

Expression des K-ras-Gens eingetreten ist. Bei den Methoden kann es sich z.B. um molekularbiologische, biochemische oder immunologische Methoden handeln.

5    Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass durch die Behandlung mittels dsRNA, welche gezielt die Expression des K-ras-Gens hemmen kann, die Proliferation von Pankreaskarzinomzellen gehemmt und sogar die Zahl vitaler Tumorzellen reduziert werden kann. Erstaunlicherweise bleibt das Proliferationsverhalten nicht maligner Zellen weit gehend unbeeinflusst von  
10    einer solchen Behandlung. Das Medikament kann eine Steigerung der Apoptose-Rate in den Zellen des Pankreaskarzinoms bewirken. In vivo ist es durch ein solches Medikament möglich, das Wachstum eines Pankreastumors effektiv zu hemmen.

15    Das K-ras-Gen kann derart mutiert sein, dass dadurch eine permanente Aktivierung von K-ras bewirkt wird. Die Hemmung der Expression eines solchen Gens durch das erfindungsgemäße Medikament bewirkt eine besonders effektive Hemmung des  
20    Wachstums des Pankreaskarzinoms. Das K-ras-Gen kann dabei in den Codons 12, 13 oder 61 mutiert sein. Im mutierten K-ras-Gen kann das Codon 12 für Arginin, Serin, Alanin, Valin, Cystein oder Asparaginsäure, das Codon 13 für Asparaginsäure oder das Codon 61 für Histidin oder Leucin kodieren. Im Wild-  
25    typ des K-ras-Gens kodiert das Codon 12 und das Codon 13 jeweils für Glycin und das Codon 61 für Glutaminsäure.

Vorzugsweise weist ein Strang S1 der dsRNA einen zum K-ras-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere  
30    aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich auf. Eine solche dsRNA ist besonders gut zur Hemmung der Expression des K-ras-Gens geeignet. Unter dem "K-ras-Gen" wird der DNA-Strang der doppelsträngigen für K-ras kodierenden DNA in der Tumorzelle verstanden, welcher komplementär zu einem bei der Transkription als Matrice dienenden  
35

DNA-Strang einschließlich aller transkribierten Bereiche ist. Bei dem K-ras-Gen handelt es sich also im Allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu einem bei der Expression des K-ras-Gens gebildeten RNA-Transkript  
5 oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z.B. einer mRNA, sein.

Der komplementäre Bereich der dsRNA kann 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweisen. Eine dsRNA mit dieser Struktur  
10 ist besonders effizient in der Inhibition des K-ras-Gens. Der Strang S1 der dsRNA kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweisen. Die Zahl dieser Nukleotide ist zugleich die Zahl der in der dsRNA maximal möglichen Basenpaare. Eine  
15 solche dsRNA ist intrazellulär besonders beständig.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Eine solche dsRNA weist gegenüber einer dsRNA ohne einzelsträngige Überhänge an mindestens einem Ende eine bessere Wirksamkeit bei der Hemmung der Expression des K-ras-Gens auf. Ein Ende ist dabei ein Bereich der dsRNA, in welchem ein 5'- und ein 3'-Strangende vorliegen. Eine nur aus  
20 dem Strang S1 bestehende dsRNA weist demnach eine Schleifenstruktur und nur ein Ende auf. Eine aus dem Strang S1 und einem Strang S2 gebildete dsRNA weist zwei Enden auf. Ein Ende wird dabei jeweils von einem auf dem Strang S1 und einem auf dem Strang S2 liegenden Strangende gebildet.

30

Vorzugsweise befindet sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1. Diese Lokalisation des einzelsträngigen Überhangs führt zu einer weiteren Steigerung der Effizienz des Medikaments. In einem Ausführungsbeispiel weist die

dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang auf. Das andere Ende ist bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Eine solche dsRNA hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blut und Serum als besonders beständig erwiesen.

Vorzugsweise weist die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 auf, d.h. sie ist aus zwei Einzelsträngen gebildet. Besonders wirksam ist das Medikament, wenn der Strang S1 (Antisinn-Strang) eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA ist dabei glatt ausgebildet. Der Strang S1 kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des K-ras-Gens komplementär sein. Vorzugsweise besteht die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 6 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll. Eine solche dsRNA ist in der Hemmung der Expression des K-ras-Gens besonders wirksam.

25

Die dsRNA kann in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegen. Der physiologisch verträgliche Puffer kann eine phosphatgepufferte Salzlösung sein. Eine micellare Struktur, ein Kapsid, ein Kapsoid oder eine polymere Nano- oder Mikrokapsel kann die Aufnahme der dsRNA in die Tumorzellen erleichtern.

35

Die polymere Nano- oder Mikrokapsel besteht aus mindestens einem biologisch abbaubaren Polymer, z.B. Polybutylcyanoacrylat. Die polymere Nano- oder Mikrokapsel kann darin enthaltene oder daran gebundene dsRNA im Körper transportieren und freisetzen.

Das Medikament kann eine Zubereitung aufweisen, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist. Eine zur Inhalation, Infusion oder Injektion geeignete Zubereitung kann im einfachsten Fall aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA bestehen. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, dass eine lediglich in einem solchen Lösungsmittel oder einem solchen Puffer gelöste und verabreichte dsRNA von den Tumorzellen aufgenommen wird und die Expression des K-ras-Gens hemmt, ohne dass die dsRNA dazu in einem besonderen Vehikel verpackt sein muss.

Vorzugsweise liegt das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vor, welche die dsRNA in einer Menge enthält, die eine Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht. Es hat es sich nämlich gezeigt, dass die dsRNA bereits in dieser Dosierung eine ausgezeichnete Effektivität in der Hemmung der Expression des K-ras-Gens aufweist. Die Verabreichungseinheit kann für eine einmalige Verabreichung bzw. Einnahme pro Tag konzipiert sein. Dann ist die gesamte Tagesdosis in einer Verabreichungseinheit enthalten. Ist die Verabreichungseinheit für eine mehrmalige Verabreichung bzw.

Einnahme pro Tag konzipiert, so ist die dsRNA darin in einer entsprechend geringeren das Erreichen der Tagesdosis ermöglichenden Menge enthalten. Die Verabreichungseinheit kann auch für eine einzige Verabreichung bzw. Einnahme für mehrere Tage konzipiert sein, z. B. indem die dsRNA über mehrere Tage freigesetzt wird. Die Verabreichungseinheit enthält dann ein entsprechend Mehrfaches der Tagesdosis.

Erfindungsgemäß ist weiterhin die Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines K-ras-Gens mittels RNA-Interferenz geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms vorgesehen. Weiterhin ist erfindungsgemäß die Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines K-ras-Gens mittels RNA-Interferenz geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms vorgesehen.

Wegen der vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verwendungen wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen beispielhaft erläutert. Als Abkürzung der Konzentrationsangabe "mol/l" wird dabei "M" verwendet. Es zeigen:

Fig. 1 die prozentuale Apoptose-Rate von humanen Pankreaskarzinomzellen YAP C in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach Transfektion mit einer zu einer ersten Sequenz aus dem humanen K-ras-Gen komplementären dsRNA,

Fig. 2 die Anzahl vitaler Zellen nach Transfektion mit einer dsRNA und



Fig. 3 das Volumen subkutan implantierter humaner Pankreasadenokarzinome in NMRI-Mäusen.

Die eingesetzten doppelsträngigen Oligoribonukleotide weisen folgende, im Sequenzprotokoll mit SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:8 bezeichneten, Sequenzen auf:

KRAS1, welche zu einer eine erste Punktmutation im Codon 12 aufweisenden Sequenz aus dem humanen K-ras-Gen in YAP C-Zellen komplementär ist:

S2: 5'- agu ugg agc ugu ugg cgu agg-3' (SEQ ID NO: 1)

S1: 3'-ca uca acc ucg aca acc gca ucc-5' (SEQ ID NO: 2)

KRAS1', welche zu einer eine erste Punktmutation im Codon 12 aufweisenden Sequenz aus dem humanen K-ras-Gen in einem humanen subkutan in NMRI-Mäusen implantierten Pankreasadenokarzinom komplementär ist:

S2: 5'- agu ugg agc uga ugg cgu agg-3' (SEQ ID NO: 3)

S1: 3'-ca uca acc ucg acu acc gca ucc-5' (SEQ ID NO: 4)

KRAS2, welche zu der Wildtyp-Sequenz aus dem humanen K-ras-Gen komplementär ist:

S2: 5'- agu ugg agc ugg ugg cgu agg-3' (SEQ ID NO: 5)

S1: 3'- ca uca acc ucg acc acc gca ucc-5' (SEQ ID NO: 6)

NEO, welche zu einer Sequenz aus dem Neomycin-Resistenz-Gen komplementär ist:

S2: 5'- c aag gau gag gau cgu uuc gca-3' (SEQ ID NO: 7)

S1: 3'-ucu guc cua cuc cua gca aag cg -5' (SEQ ID NO: 8)

Zellen der humanen Pankreaskarzinomzelllinie YAP C, welche unter der Nr. ACC 382 von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig bezogen werden können, wurden unter konstanten Bedingungen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640-Medium (Fa. Biochrom, Berlin) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Die Transfektionen wurden in einer 6-Well-Platte mit Oligofectamine (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Pro Well wurden 150 000 Zellen ausgesetzt. Die Transfektion der doppelsträngigen Oligoribonukleotide wurde nach dem von Invitrogen für Oligofectamine empfohlenen Protokoll durchgeführt (Angaben beziehen sich auf eine Vertiefung bzw. ein Well einer 6-Well-Platte):

10 µl des doppelsträngigen Oligoribonukleotids (0,1 - 10 µM) wurden mit 175 µl Zellkulturmedium ohne Zusätze verdünnt. 3 µl Oligofectamine wurden mit 12 µl Zellkulturmedium ohne Zusätze verdünnt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das so verdünnte Oligofectamine wurde zu den bereits verdünnten doppelsträngigen Oligoribonukleotiden gegeben, gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die zu transfizierenden Zellen einmal mit Zellkulturmedium ohne Zusätze gewaschen und 800 µl frisches Zellkulturmedium zugegeben. Danach wurden pro Well 200 µl des beschriebenen Oligofectamine-dsRNA-Gemisches zugegeben, so dass das Endvolumen für die Transfektion 1000 µl betrug. Hierdurch ergibt sich eine Endkonzentration der doppelsträngigen Oligoribonukleotide von 1-100 nM. Der Transfektionsansatz wurde vier Stunden bei 37°C bebrütet. Danach wurden pro Well 500 µl Zellkulturmedium mit 30% FKS zugegeben, so dass die Endkonzentration an FKS 10% betrug. Dieser Ansatz wurde für 24 bis 120 Stunden bei 37°C inkubiert.

Zur Bestimmung der Apoptose-Rate wurden die Überstände nach der Inkubation gesammelt, die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, mittels Trypsin abgelöst und 10 Minuten mit 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit hypotoner Propidiumjodidlösung 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch im Fluoreszenz-unterstützten Zellsortierer FACSCalibur (Fa. BD GmbH, Heidelberg).

Fig. 1 zeigt die prozentuale Apoptose-Rate humaner Pankreaskarzinomzellen YAP C in Abhängigkeit von der Inkubationszeit nach Transfektion mit steigenden Konzentrationen der dsRNA KRAS1. Daraus ist ersichtlich, dass KRAS1 konzentrationsabhängig Apoptose in humanen Pankreaskarzinomzellen induziert. Die Apoptose-Rate steigt in Abhängigkeit von der Inkubationszeit an. Während unbehandelte YAP C-Zellen (Kontrolle) und Zellen, mit welchen das beschriebene Verfahren zur Transfektion ohne doppelsträngiges Oligoribonukleotid durchgeführt wurde (Mocktransfektion bzw. Scheintransfektion), auch nach 120 h Inkubation nur maximal 5% Apoptose aufwiesen, konnte durch Transfektion mit 100 nM KRAS1 die Apoptose-Rate nach 120 h auf 24% gesteigert werden. Mit gleicher Effektivität induzierte die zum Wildtyp von K-ras komplementäre dsRNA KRAS2 Apoptose in YAP C-Zellen.

Zur Bestimmung des Einflusses der Transfektionen auf die Proliferation bzw. die Zahl vitaler Zellen, wurden pro Vertiefung einer 6-Well-Platte 50 000 YAP-C-Zellen ausgesetzt und wie oben beschrieben transfiziert. Die Anzahl vitaler Zellen wurde mit der Trypanblau-Ausschluss-Färbung nach 24 bis 120 h Inkubationszeit durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Das Ergebnis ist in Fig. 2 dargestellt. Die Proliferation von YAP C-Zellen konnte durch KRAS1 konzentrationsabhängig gehemmt werden. Die Zahl vitaler Zellen konnte

bereits durch 1 nM KRAS1 statistisch signifikant ( $p = 0,001$  vs. unbehandelte Kontrolle nach 120 h) reduziert werden.

Eine Transfektion mit der zum K-ras-Wildtyp komplementären dsRNA KRAS2 führte bei einer Konzentration von 100 nM zu einer Reduktion der Zahl vitaler Zellen. Nicht-maligne humane Hautfibroblasten zeigten keine Änderung ihres Proliferationsverhaltens durch Transfektion mit KRAS1 oder KRAS2.

Für in vivo-Untersuchungen sind NMRI-Mäusen (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln) Gewebefragmente von 2 - 3 mm Durchmesser aus einem humanen Pankreasadenokarzinom subkutan implantiert worden. Nachdem die Tumoren eine Größe von 6 - 7 mm erreicht hatten, wurden täglich 200  $\mu\text{g}$  KRAS1' oder NEO pro kg Körpergewicht, jeweils gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle wurde eine physiologische Kochsalzlösung injiziert. Die Tumore wurden täglich mittels einer Schiebelehre bzw. einer standardisierten Schablone vermessen. In Fig. 3 ist das in  $\text{mm}^3$  gemessene Tumorumfassen als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts in Abhängigkeit von der in Tagen bemessenen Zeit ab Beginn der Behandlung durch die intraperitonealen Injektionen (Tage i.p.) dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die zum K-ras-Gen komplementäre dsRNA in der Lage ist, das Wachstum der Tumore zu hemmen. Durch tägliche intraperitoneale Applikation der zum K-ras-Gen komplementären dsRNA in einer Dosierung von 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  wurde das Wachstum des Tumors derart gehemmt, dass das Tumorumfassen nach 24 Tagen Behandlung nur 62% des Tumorumfassens der Kontrollgruppe betragen hat.

## Patentansprüche

1. Medikament zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms, wobei das Medikament eine zu einer Hemmung der Expression eines K-ras-Gens mittels RNA-Interferenz geeignete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) enthält.
2. Medikament nach Anspruch 1, wobei das K-ras-Gen derart mutiert ist, dass dadurch eine permanente Aktivierung von K-ras bewirkt wird.
3. Medikament nach Anspruch 1 oder 2, wobei das K-ras-Gen in den Codons 12, 13 oder 61 mutiert ist.
4. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei im K-ras-Gen das Codon 12 für Arginin, Serin, Alanin, Valin, Cystein oder Asparaginsäure, das Codon 13 für Asparaginsäure oder das Codon 61 für Histidin oder Leucin kodiert.
5. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum K-ras-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.
6. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
7. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
8. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbeson-

dere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.

9. Medikament nach Anspruch 8, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

5 10. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.

10 11. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.

12. Medikament nach Anspruch 11, wobei der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.

13. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des K-ras-Gens komplementär ist.

20 14. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 6 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.

25 15. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struktur

30

tur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikro kapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikro kapsel gebunden vorliegt.

- 5 16. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.
- 10 17. Medikament nach Anspruch 16, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch verträglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.
- 15 18. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Medikament in mindestens einer Verabreichungseinheit vorliegt, welche die dsRNA in einer Menge enthält, die eine Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, vorzugsweise höchstens 50 µg, insbesondere höchstens 25 µg, pro kg Körpergewicht und Tag ermöglicht.
- 20 19. Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines K-ras-Gens mittels RNA-Interferenz geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms.
- 25 20. Verwendung einer zur Hemmung der Expression eines K-ras-Gens mittels RNA-Interferenz geeigneten doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms.
- 30

21. Verwendung nach Anspruch 19 oder 20, wobei das K-ras-Gen derart mutiert ist, dass dadurch eine permanente Aktivierung von K-ras bewirkt wird.
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 21, wobei das  
5 K-ras-Gen in den Codons 12, 13 oder 61 mutiert ist.
23. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 22, wobei im K-ras-Gen das Codon 12 für Arginin, Serin, Alanin, Valin, Cystein oder Asparaginsäure, das Codon 13 für Asparaginsäure oder das Codon 61 für Histidin oder Leucin kodiert.
- 10 24. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 23, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum K-ras-Gen zumindest abschnittsweise komplementären, insbesondere aus weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotiden bestehenden, Bereich aufweist.
- 15 25. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 24, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 20 bis 24, besonders bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22 oder 23, Nukleotide aufweist.
- 20 26. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 25, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, insbesondere 23, Nukleotide aufweist.
- 25 27. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 26, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
28. Verwendung nach Anspruch 27, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
- 30 29. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 28, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des



Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.

30. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 29, wobei die dsRNA neben dem Strang S1 einen Strang S2 aufweist.

5 31. Verwendung nach Anspruch 30, wobei der Strang S1 eine Länge von 23 Nukleotiden, der Strang S2 eine Länge von 21 Nukleotiden und das 3'-Ende des Strangs S1 einen aus zwei Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist, während das am 5'-Ende des Strangs S1 gelegene Ende der dsRNA glatt ausgebildet ist.

32. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 31, wobei der Strang S1 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des K-ras-Gens komplementär ist.

15 33. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 32, wobei die dsRNA aus dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 oder dem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 5 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 6 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.

25 34. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 33, wobei die dsRNA in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer oder einer physiologischen Kochsalzlösung, von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Kapsid, einem Kapsoid oder einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel umschlossen oder an einer polymeren Nano- oder Mikrokapsel gebunden vorliegt.

30 35. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 34, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere

zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.

36. Verwendung nach Anspruch 35, wobei die Zubereitung, insbesondere ausschließlich, aus einem physiologisch ver-  
5 träglichen Lösungsmittel, vorzugsweise einer physiologischen Kochsalzlösung oder einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.
37. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 36, wobei die  
10 dsRNA oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, verabreicht wird.
38. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 37, wobei die  
15 dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200  $\mu\text{g}$ , besonders bevorzugt höchstens 100  $\mu\text{g}$ , vorzugsweise höchstens 50  $\mu\text{g}$ , insbesondere höchstens 25  $\mu\text{g}$ , pro kg Körpergewicht und Tag verwendet wird.

1/3

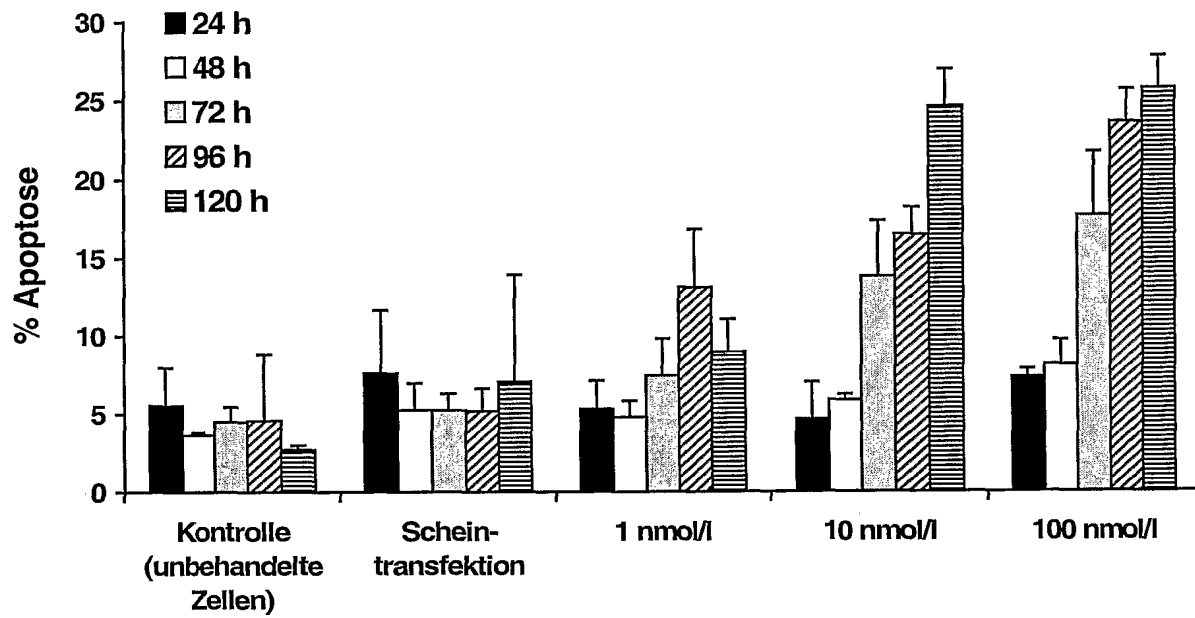


Fig. 1

2/3

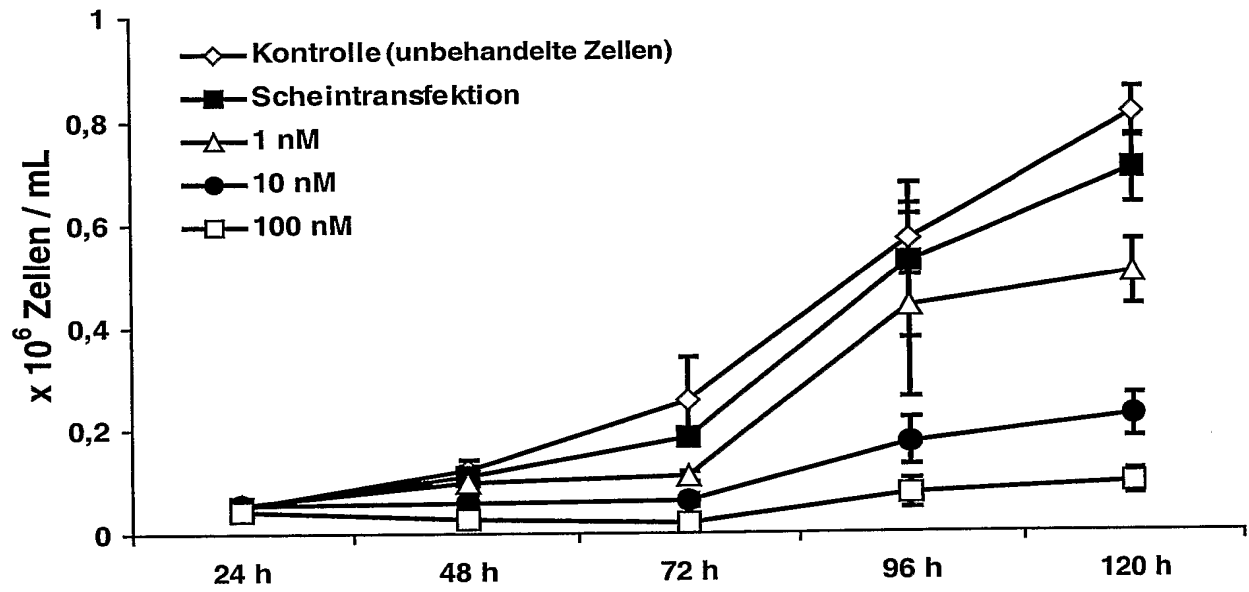


Fig. 2

3/3

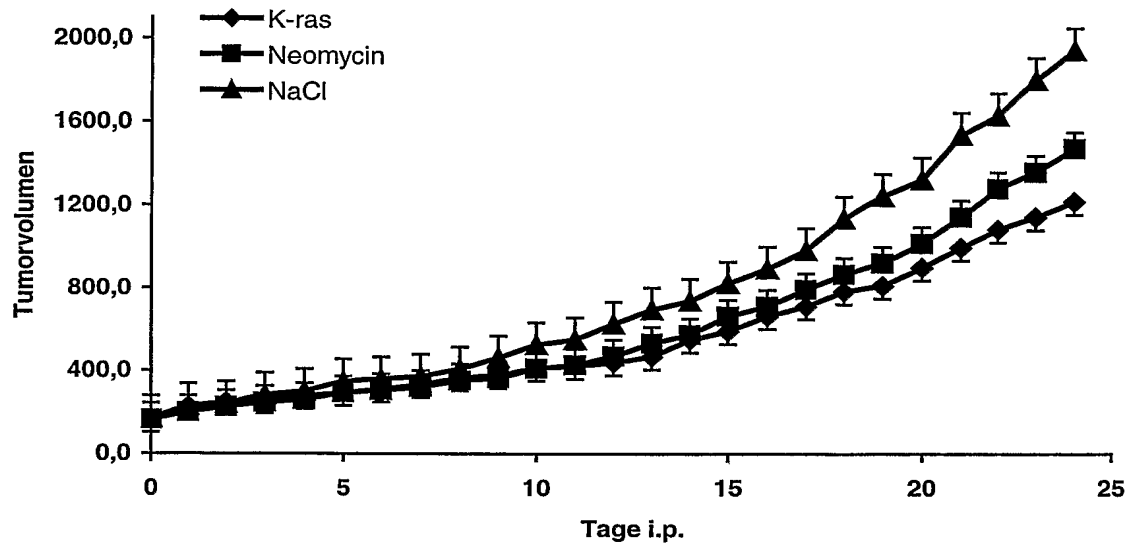


Fig. 3

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Ribopharma AG

5 &lt;120&gt; Medikament zur Behandlung eines Pankreaskarzinoms

&lt;130&gt; 422271EH

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 8

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

20

&lt;400&gt; 1

aguuggagcu guuggcguag g

21

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

25

&lt;400&gt; 2

ccuacgcaa cagcuccaac uac

23

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

35

&lt;400&gt; 3

aguuggagcu gauggcguag g

21

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

45

&lt;400&gt; 4

ccuacgccau cagcuccaac uac

23

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

55

&lt;400&gt; 5

aguuggagcu gguggcguag g

21

&lt;210&gt; 6

60

<211> 23  
<212> RNA  
<213> Homo sapiens

5 <400> 6  
ccuacgccac cagcuccaac uac 23

10 <210> 7  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> Künstliche Sequenz

15 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang  
einer zu einer Sequenz des Neomycin-Resistenzgens  
komplementären dsRNA

20 <400> 7  
caaggaugag gaucguuucg ca 22

25 <210> 8  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> Künstliche Sequenz

30 <220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des  
Neomycin-Resistenzgens komplementären dsRNA

35 <400> 8  
gcgaaacgau ccucauccug ucu 23

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati Application No  
PCT/EP 02/11970

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/88 C07K14/18 C07K14/82		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	BRUMMELKAMP THIJN R ET AL: "Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference." CANCER CELL. UNITED STATES SEP 2002, vol. 2, no. 3, September 2002 (2002-09), pages 243-247, XP009006464 ISSN: 1535-6108	1-13, 15-32, 34-38
P, Y	the whole document ---	14, 33
Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INST TE) 11 October 2001 (2001-10-11) the whole document ---	1-38
P, Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6 June 2002 (2002-06-06) the whole document ---	1-38
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  27 February 2003		Date of mailing of the international search report  13/03/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Armandola, E



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati Application No  
PCT/EP 02/11970

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 101, no. 3, 28 April 2000 (2000-04-28), pages 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 the whole document ---	1-38
Y	WO 00 44914 A (FARRELL MICHAEL J ;LI YIN XIONG (US); KIRBY MARGARET L (US); MEDIC) 3 August 2000 (2000-08-03)  the whole document ---	1-7, 11, 13, 15, 17, 19-26, 30, 34-37
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 101, no. 1, 31 March 2000 (2000-03-31), pages 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 the whole document ---	5-12, 24-32
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 411, no. 6836, 2001, pages 494-498, XP002213433 ISSN: 0028-0836 the whole document ---	5-12, 24-32
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, vol. 15, no. 2, 15 January 2001 (2001-01-15), pages 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369 the whole document ---	5-12, 24-32
P,Y	TUSCHL THOMAS: "Expanding small RNA interference." NATURE BIOTECHNOLOGY. UNITED STATES MAY 2002, vol. 20, no. 5, May 2002 (2002-05), pages 446-448, XP002232258 ISSN: 1087-0156 page 448; figure 1 ---	1-38
	--- -/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati Application No  
PCT/EP 02/11970

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>KITA K ET AL: "Growth inhibition of human pancreatic cancer cell lines by anti-sense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes."</p> <p>INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER. UNITED STATES 9 FEB 1999, vol. 80, no. 4, 9 February 1999 (1999-02-09), pages 553-558, XP002232259 ISSN: 0020-7136 the whole document</p>	1-38
Y	<p>NAKANO M ET AL: "Suppression of colorectal cancer growth using an adenovirus vector expressing an antisense K-ras RNA."</p> <p>MOLECULAR THERAPY: THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY. UNITED STATES APR 2001, vol. 3, no. 4, April 2001 (2001-04), pages 491-499, XP002232260 ISSN: 1525-0016 the whole document</p>	1-38
Y	<p>AOKI K ET AL: "Liposome-mediated in vivo gene transfer of antisense K-ras construct inhibits pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity."</p> <p>CANCER RESEARCH. UNITED STATES 1 SEP 1995, vol. 55, no. 17, 1 September 1995 (1995-09-01), pages 3810-3816, XP001145722 ISSN: 0008-5472 the whole document</p>	1-38
Y	<p>AOKI K ET AL: "Suppression of Ki-ras p21 levels leading to growth inhibition of pancreatic cancer cell lines with Ki-ras mutation but not those without Ki-ras mutation."</p> <p>MOLECULAR CARCINOGENESIS. UNITED STATES OCT 1997, vol. 20, no. 2, October 1997 (1997-10), pages 251-258, XP001145717 ISSN: 0899-1987 the whole document</p>	1-38

---  
-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/EP 02/11970

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>NAKADA Y ET AL: "Antisense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes inhibit invasiveness of human pancreatic cancer cell lines."</p> <p>PANCREATOLOGY: OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF PANCREATOLOGY (IAP)... 'ET AL.!. SWITZERLAND 2001, vol. 1, no. 4, 2001, pages 314-319, XP009006374</p> <p>ISSN: 1424-3903</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	1-38
Y	<p>WICKSTROM E: "Oligonucleotide treatment of ras-induced tumors in nude mice."</p> <p>MOLECULAR BIOTECHNOLOGY. UNITED STATES MAY 2001, vol. 18, no. 1, May 2001 (2001-05), pages 35-55, XP001145693</p> <p>ISSN: 1073-6085</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	1-38
Y	<p>GIANNINI C D ET AL: "Enzymatic and antisense effects of a specific anti-Ki-ras ribozyme in vitro and in cell culture."</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH. ENGLAND 1 JUL 1999, vol. 27, no. 13, 1 July 1999 (1999-07-01), pages 2737-2744, XP001145723</p> <p>ISSN: 0305-1048</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	1-38
P,Y	<p>OCKER M. ET AL.: "bcl-2 specific siRNA molecules inhibit growth of pancreatic cancer in vitro and in vivo"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 38, November 2002 (2002-11), pages S142-S143, XP004403918</p> <p>ISSN: 0959-8049</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	1-4, 15-23, 34-38
A	<p>WIANNY F ET AL: "Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development"</p> <p>NATURE CELL BIOLOGY, MACMILLAN PUBLISHERS, GB, vol. 2, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 70-75, XP002138445</p> <p>ISSN: 1465-7392</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat      Application No  
PCT/EP 02/11970

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference"</p> <p>MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US,</p> <p>vol. 6, no. 5, November 2000 (2000-11), pages 1077-1087, XP002226298</p> <p>ISSN: 1097-2765</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	Application No
PCT/EP 02/11970	

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0175164	A	11-10-2001	AU	3574402 A		11-06-2002
			AU	4962201 A		15-10-2001
			WO	0244321 A2		06-06-2002
			WO	0175164 A2		11-10-2001
			US	2002086356 A1		04-07-2002
<hr/>						
WO 0244321	A	06-06-2002	AU	3574402 A		11-06-2002
			AU	4962201 A		15-10-2001
			WO	0244321 A2		06-06-2002
			WO	0175164 A2		11-10-2001
			US	2002086356 A1		04-07-2002
<hr/>						
WO 0044914	A	03-08-2000	AU	2634800 A		18-08-2000
			CA	2361201 A1		03-08-2000
			EP	1147204 A1		24-10-2001
			WO	0044914 A1		03-08-2000
			US	2002114784 A1		22-08-2002
<hr/>						

## PCT/EP 02/11970

IPK 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/88 C07K14/18 C07K14/82

IPK 7 C12N C07K

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------

P,X	BRUMMELKAMP THIJN R ET AL: "Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference." CANCER CELL. UNITED STATES SEP 2002, Bd. 2, Nr. 3, September 2002 (2002-09), Seiten 243-247, XP009006464 ISSN: 1535-6108
P,Y	das ganze Dokument
Y	WO 01 75164 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); MASSACHUSETTS INSTITUTE) 11. Oktober 2001 (2001-10-11) das ganze Dokument
P,Y	WO 02 44321 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;TUSCHL THOMAS (DE); ELBASHIR SAYDA (DE);) 6. Juni 2002 (2002-06-06) das ganze Dokument

1-13,  
15-32,  
34-38

14.33

1-38

1-38

DATE / TIME

**X** Siehe Anhang Patentfamilie

\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

**\*X\*** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

**\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindungen für einen Fachmann naheliegend ist**

'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/03/2003

Bevollmächtigter Bediensteter

Armando]a. E

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/11970

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, Bd. 101, Nr. 3, 28. April 2000 (2000-04-28), Seiten 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument ---	1-38
Y	WO 00 44914 A (FARRELL MICHAEL J ;LI YIN XIONG (US); KIRBY MARGARET L (US); MEDIC) 3. August 2000 (2000-08-03)  das ganze Dokument ---	1-7,11, 13,15, 17, 19-26, 30,34-37
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, Bd. 101, Nr. 1, 31. März 2000 (2000-03-31), Seiten 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument ---	5-12, 24-32
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, Bd. 411, Nr. 6836, 2001, Seiten 494-498, XP002213433 ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument ---	5-12, 24-32
Y	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, Bd. 15, Nr. 2, 15. Januar 2001 (2001-01-15), Seiten 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369 das ganze Dokument ---	5-12, 24-32
P,Y	TUSCHL THOMAS: "Expanding small RNA interference." NATURE BIOTECHNOLOGY. UNITED STATES MAY 2002, Bd. 20, Nr. 5, Mai 2002 (2002-05), Seiten 446-448, XP002232258 ISSN: 1087-0156 Seite 448; Abbildung 1 ---	1-38
	--- -/--	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat es Aktenzeichen

PCT/EP 02/11970

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>KITA K ET AL: "Growth inhibition of human pancreatic cancer cell lines by anti-sense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes."</p> <p>INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER. UNITED STATES 9 FEB 1999, Bd. 80, Nr. 4, 9. Februar 1999 (1999-02-09), Seiten 553-558, XP002232259 ISSN: 0020-7136 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-38
Y	<p>NAKANO M ET AL: "Suppression of colorectal cancer growth using an adenovirus vector expressing an antisense K-ras RNA."</p> <p>MOLECULAR THERAPY: THE JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF GENE THERAPY. UNITED STATES APR 2001, Bd. 3, Nr. 4, April 2001 (2001-04), Seiten 491-499, XP002232260 ISSN: 1525-0016 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-38
Y	<p>AOKI K ET AL: "Liposome-mediated in vivo gene transfer of antisense K-ras construct inhibits pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity."</p> <p>CANCER RESEARCH. UNITED STATES 1 SEP 1995, Bd. 55, Nr. 17, 1. September 1995 (1995-09-01), Seiten 3810-3816, XP001145722 ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-38
Y	<p>AOKI K ET AL: "Suppression of Ki-ras p21 levels leading to growth inhibition of pancreatic cancer cell lines with Ki-ras mutation but not those without Ki-ras mutation."</p> <p>MOLECULAR CARCINOGENESIS. UNITED STATES OCT 1997, Bd. 20, Nr. 2, Oktober 1997 (1997-10), Seiten 251-258, XP001145717 ISSN: 0899-1987 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-38
	<p>---</p> <p>-/--</p>	



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internati s Aktenzeichen

PCT/EP 02/11970

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>NAKADA Y ET AL: "Antisense oligonucleotides specific to mutated K-ras genes inhibit invasiveness of human pancreatic cancer cell lines."</p> <p>PANCREATOLOGY: OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF PANCREATOLOGY (IAP)... 'ET AL.!. SWITZERLAND 2001, Bd. 1, Nr. 4, 2001, Seiten 314-319, XP009006374</p> <p>ISSN: 1424-3903</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-38
Y	<p>WICKSTROM E: "Oligonucleotide treatment of ras-induced tumors in nude mice."</p> <p>MOLECULAR BIOTECHNOLOGY. UNITED STATES MAY 2001, Bd. 18, Nr. 1, Mai 2001 (2001-05), Seiten 35-55, XP001145693</p> <p>ISSN: 1073-6085</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-38
Y	<p>GIANNINI C D ET AL: "Enzymatic and antisense effects of a specific anti-Ki-ras ribozyme in vitro and in cell culture."</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH. ENGLAND 1 JUL 1999, Bd. 27, Nr. 13, 1. Juli 1999 (1999-07-01), Seiten 2737-2744, XP001145723</p> <p>ISSN: 0305-1048</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-38
P,Y	<p>OCKER M. ET AL.: "bcl-2 specific siRNA molecules inhibit growth of pancreatic cancer in vitro and in vivo"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, Bd. 38, November 2002 (2002-11), Seiten S142-S143, XP004403918</p> <p>ISSN: 0959-8049</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-4, 15-23, 34-38
A	<p>WIANNY F ET AL: "Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development"</p> <p>NATURE CELL BIOLOGY, MACMILLAN PUBLISHERS, GB, Bd. 2, Nr. 2, Februar 2000 (2000-02), Seiten 70-75, XP002138445</p> <p>ISSN: 1465-7392</p> <p>---</p> <p>--- -/--</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat als Aktenzeichen

PCT/EP 02/11970

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference"</p> <p>MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US,</p> <p>Bd. 6, Nr. 5, November 2000 (2000-11), Seiten 1077-1087, XP002226298 ISSN: 1097-2765</p> <p>-----</p>	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internatio Aktenzeichen  
PCT/EP 02/11970

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0175164 A	11-10-2001	AU 3574402 A	11-06-2002
		AU 4962201 A	15-10-2001
		WO 0244321 A2	06-06-2002
		WO 0175164 A2	11-10-2001
		US 2002086356 A1	04-07-2002
WO 0244321 A	06-06-2002	AU 3574402 A	11-06-2002
		AU 4962201 A	15-10-2001
		WO 0244321 A2	06-06-2002
		WO 0175164 A2	11-10-2001
		US 2002086356 A1	04-07-2002
WO 0044914 A	03-08-2000	AU 2634800 A	18-08-2000
		CA 2361201 A1	03-08-2000
		EP 1147204 A1	24-10-2001
		WO 0044914 A1	03-08-2000
		US 2002114784 A1	22-08-2002